



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2003-0034915
Application Number

출원년월일 : 2003년 05월 30일
Date of Application MAY 30, 2003

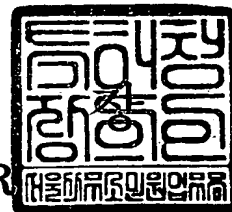
출원인 : 광주과학기술원
Applicant(s) Kwangju Institute of Science and Technology



2003 년 10 월 15 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0001
【제출일자】	2003.05.30
【국제특허분류】	C12N
【발명의 명칭】	벤조산 및 그 유도체의 탐지를 위한 형질전환용 재조합 벡터, 그 형질전환체 및 동 형질전환체를 이용한 벤조산 및 그 유도체의 탐지방법
【발명의 영문명칭】	Recombinant Vector Detecting Benzoate and It's Derivatives, and Transformant thereof, and Detecting Method Using The Transformant
【출원인】	
【명칭】	광주과학기술원
【출원인코드】	3-1998-099381-5
【대리인】	
【성명】	황이남
【대리인코드】	9-1998-000610-1
【포괄위임등록번호】	1999-003892-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	구만복
【성명의 영문표기】	GU, Man-Bock
【주민등록번호】	650520-1046823
【우편번호】	506-302
【주소】	광주광역시 광산구 월계동 금광아파트 104동 506호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	로버트 제이 미첼
【성명의 영문표기】	MITCHELL, Robert J
【주민등록번호】	720605-7105917
【우편번호】	500-480
【주소】	광주광역시 북구 오룡동 1 기혼자아파트 F동 705호
【국적】	KR

【심사청구】 청구

【미생물기탁】

【기탁기관명】 한국농용미생물보존센터

【수탁번호】 KACC 91044

【수탁일자】 2003.04.04

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 3

【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
황이남 (인)

【수수료】

【기본출원료】 18 면 29,000 원

【가산출원료】 0 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 7 항 333,000 원

【합계】 362,000 원

【감면사유】 정부출연연구기관

【감면후 수수료】 181,000 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2.미생물기탁증명서_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 발광단백질을 코딩하는 소정의 발광유전자와, 상기 발광유전자의 발현을 유도하는 일련의 유전자 세트를 포함하며, 상기 유전자 세트는 조절유전자 nagR과, 상기 유전자 nagR에 의해 코딩되는 단백질 NagR에 의해 상기 발광유전자의 전사를 유도하는 프로모터 부위를 구비함을 특징으로 하는 벤조산 및 그 유도체의 탐지를 위한 형질전환용 재조합 벡터 및 그 형질전환체와, 동 형질전환체를 검체와 반응시켜 발생하는 발광량에 의해 벤조산 및 그 유도체를 탐지하는 방법을 제공한다.

【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

벤조산 및 그 유도체의 탐지를 위한 형질전환용 재조합 벡터, 그 형질전환체 및 동 형질전환체를 이용한 벤조산 및 그 유도체의 탐지방법{Recombinant Vector Detecting Benzoate and It's Derivatives, and Transformant thereof, and Detecting Method Using The Transformant}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 따른 재조합벡터 pNAG1의 제조과정도

도 2는 본 발명에 따른 재조합 벡터 pNAG1을 EcoR1과 Kpn1 제한효소로 잘라내어 아가로스젤 전기영동으로 확인한 결과사진(왼쪽레인 : 마커, 오른쪽레인 : 벡터 절편)

도 3은 본 발명에 따른 형질전환체 EBNAG1에 벤조산(a)과 그 유도체인 살리실산(b)을 농도별로 처리한 후 발광 변화정도를 관찰한 결과 그래프.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<4> 본 발명은 벤조산 및 그 유도체의 탐지를 위한 형질전환용 재조합 벡터, 그 형질전환체 및 동 형질전환체를 이용한 벤조산 및 그 유도체의 탐지방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 폴리 아로마틱 하이드로 카본류 등에 오염되어 있는 토양의 복원정도를 판단할 수 있게 해주는 벤조산 및 그 유도체의 탐지를 위한 형질전환용 재조합 벡터, 그 형질전환체 및 상기 형질전환

체를 이용하여 형질전환체와 검체를 반응시켜 발생하는 발광량에 의해 벤조산 및 그 유도체를 탐지하는 방법에 관한 것이다.

- <5> 방향족 화합물은 그 구조가 안정하여 자연적인 분해가 어려워 토양 등에 노출되면 심각한 토양 오염을 초래한다. 난분해성 화합물인 폴리 아로마틱 하이드로카본(Poly Aromatic Hydrocarbon)류는 토양 미생물에 의해 일부가 분해되어 탄소원으로 사용된다. 이에 따라, 미생물을 이용한 생물학적 토양 복원 방법이 활발하게 이루어지고 있다.
- <6> 벤조산 및 그 유도체들은 폴리 아로마틱 화합물들의 자연적인 분해 과정에서 나타나는 중간 대사 물질이며, 방향족 화합물의 일종이다. 따라서 폴리 아로마틱 하이드로카본류에 오염되어 있는 토양의 복원 과정 중 벤조산 및 그 유도체를 분석하면 토양 복원 정도를 평가할 수 있다.
- <7> 하지만, 종래 기기분석 방법으로는 화학물질의 정량적인 분석 데이터를 제공해 주는 장점이 있으나, 환경 독성학적으로 분석하고자 하는 화학물질의 독성이나 혹은 세포내의 반응에 대한 분석이 불가능하다는 단점이 있다.
- <8> 최근 들어 박테리아의 발광성을 이용하여 화학물질의 독성과 그 종류를 파악하려는 시도가 활발히 진행 중에 있다. 발광 유전자 앞에 스트레스 유발시 발광물질의 발현을 유도하는 스트레스 프로모터를 결합하여 화학물질에 의한 특정 스트레스의 유발 정도를 발광의 정도로서 판단하는 방법이 보고된 바 있다(M.B.Gu and S.H.Choi Water Science and Technology 43:147-154). 또한, 특정 화학물질의 탐지를 위해 당해 화학물질 분해의 중간 대사에 관여하는 단백질 코딩 유전자 및 그 유도 프로모터가 이용되기도 한다(Burlage, R.S., Sayler, G.S., Larimer, F, J. Bacteriol. 172:4749-4757). 따라서, 유전자 재조합을 이용한 발광 박테리아 제작기술은 화학물질의 생물학적 시험방법에 광범위하게 응용이 가능한 기술이다.

<9> 하지만, 종래 보고된 상기와 같은 생물학적 시험방법의 우수성에도 불구하고 아직까지 폴리 아로마틱 하이드로카본류에 오염되어 있는 토양의 복원 과정 중 벤조산 및 그 유도체를 분석할 수 있는 어떠한 수단도 제공하고 있지 못한 실정이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<10> 본 발명은 상기한 바와 같이 종래기술이 가지는 문제를 해결하기 위해 안출된 것으로, 그 주된 목적은 토양의 복원정도를 판단할 수 있게 해주는 벤조산 및 그 유도체의 탐지를 위한 형질전환용 재조합 벡터를 제공함에 있다.

<11> 본 발명의 다른 목적은 재조합 벡터를 대장균에 형질전환시켜 얻은 형질전환체를 제공함에 있다.

<12> 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용하여 형질전환체와 검체를 반응시켜 발생하는 발광량에 의해 벤조산 및 그 유도체를 탐지하는 방법을 제공함에 있다.

【발명의 구성 및 작용】

<13> 본 발명은 벤조산 및 그 유도체의 탐지를 위한 형질전환용 재조합 벡터에 있어서, 발광 단백질을 코딩하는 소정의 발광유전자와, 상기 발광유전자의 발현을 유도하는 일련의 유전자 세트를 포함하며, 상기 유전자 세트는 조절유전자 nagR과, 상기 유전자 nagR에 의해 코딩되는 단백질 NagR에 의해 상기 발광유전자의 전사를 유도하는 프로모터 부위를 구비하는 벤조산 및 그 유도체의 탐지를 위한 형질전환용 재조합 벡터를 제공한다.

<14> 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 대장균에 형질전환하여 제조되는 형질전환체를 제공한다.

- <15> 또한, 본 발명은 상기 형질전환체와 검체를 반응시켜 발생하는 발광량에 의해 벤조산 및 그 유도체를 탐지하는 방법을 제공한다.
- <16> 상기에서 nagR 유전자는 조절단백질인 NagR을 발현하며, 상기 조절단백질은 나프탈렌을 겐티세이트(gentisate)로 전환시키는데 관여하는 nag 오페론, 즉 nagAaGHAbAcAdBFCQED을 포함하는 유전자들을 작동시키는 프로모터에 결합하여 상기 오페론의 전사를 조절하는 것으로 알려져 있다.(S.L.Fuenmayor, M.Wild, A.L.Boyes, and P.A.Williams, J.Bacteriol. 180:2522-2530)
- <17> 상기에서 nag 오페론의 프로모터 부위는 P_{nagG} 로 표시되며, 상기 nagR 유전자로부터 발현되는 조절단백질 NagR에 의해 그 작동이 조절된다. 그 주요기작은 벤조산 및 그 유도체가 상기 조절 단백질에 결합한 상태에서 상기 조절단백질이 프로모터 부위에 결합하여 발광유전자의 발현에 영향을 미치는 것으로 설명이 될 수 있다.
- <18> 상기에서 발광유전자의 발현을 유도하기 위한 유전자 세트는 nagR 유전자와, nag 오페론의 프로모터 부위인 P_{nagG} 를 포함한다. 상기 유전자 세트(nagR- P_{nagG})는 전체가 하나의 프로모터로서 기능하며, 칼스토니아 에스피.U2로부터 서열번호 1의 5'프라이머 (5'-GTCACCAATATGGACCAGGCAACGC-3') 및 서열번호 2 기재의 3'프라이머 (5'-CCGCGTCTAGATGCTAATTGAGGGG-3')를 이용하여 PCR증폭을 통해 얻을 수 있다. 이때 얻어지는 PCR 산물은 소정의 제한효소로 처리되고, 이를 동일한 제한효소로서 처리한 소정의 벡터에 삽입시켜 재조합 벡터를 제조한 후, 상기 재조합 벡터를 발광유전자를 갖는 소정의 벡터와 재조합시켜 벤조산 및 그 유도체의 탐지를 위한 대장균 형질전환용 재조합벡터를 제작할 수 있다.

- <19> 이하, 본 발명의 내용을 도면을 참조하여 보다 상세하게 설명한다. 도 1은 본 발명의 바람직한 실시예로서, 벤조산 및 그 유도체의 탐지를 위한 대장균 형질전환용 재조합백터의 일 제조예 및 그 개열지도를 보여주고 있다. 상기 도시된 재조합 플라스미드 pNAG1은 칼스토니아 에스피.U2로부터 나프탈렌 분해대사 과정을 증진시키는 nagR 유전자와 nag 오페론의 프로모터인 P_{nagG} 를 nag 오페론으로부터 뽑아내어 프로모터로 사용하였고, 이를 발광유전자인 luxCDABE와 융합하여 제작한 것이다.
- <20> 칼스토니아 에스피.U2의 게놈으로부터 서열번호 1 및 서열번호 2를 프라머로 하여 증폭한 서열번호 3의 PCR산물 1.331kb는 nagR 유전자의 다운스트림 -266bp와 업스트림 +176bp을 포함하며, nagR[267~1172bp]과 nagAa 유전자의 프로모터 부위[1173~1288bp]를 함유하고 있다. 상기 PCR 산물은 제한효소 XbaI과 HindIII로 처리되고, 동일한 효소로 처리한 벡터 pSP-luc+에 상기 제한효소처리된 PCR 산물을 재조합시켜 재조합백터 pNAG9을 제조한다.
- <21> 상기 pNAG9 플라스미드에 KpnI과 EcoRI 제한효소를 처리하고, 역시 동일한 제한 효소로 처리한 luxCDABE를 함유하는 pUCD615의 다중클로닝부위에 재조합하고 이를 pNAG1이라 명명하였다. 바람직하게는, 상기 재조합 플라스미드 pNAG1은 항생제 저항성 유전자를 구비한다. 이러한 항생제 저항성 유전자로 될 수 있는 유전자는 현재 다수가 공지되어 있다(예를 들어, 카나마이신, 앰피실린, 테트라사이클린 등). 따라서, 당업자는 상기 공지된 항생제 저항성 유전자들로부터 원하는 유전자를 취사선택하여 사용하는 것이 가능하며 이러한 유전자의 구체적인 종류는 본 발명의 본질을 구성하는 것은 아니다. 뿐만 아니라, 이러한 항생제 저항성 유전자의 도입은 형질전환체를 선발하기 위한 것이므로, 선발에 사용될 수 있는 유전자라면 어떠한 것도 도입될 수 있다. 따라서, 항생제 저항성 유전자에만 한정되는 것은 아니다.



- <22> 본 발명의 실시예에서는 상기 재조합 플라즈미드 pNAG1으로 형질전환시킬 미생물에 대장균 RFM443 균주가 사용되었다. 특별히 한정되는 것은 아니지만 대장균은 배양조건이 까다롭지 않고 조작하기에 편리하여 본 발명의 실시예 가장 적합하다. pNAG1 플라즈미드는 카나마이신과 앰피실린 저항성 유전자를 가지며, 대장균 RFM443에 도입시킨 다음 앰피실린이 들어있는 LB 배지에서 pNAG1이 포함된 콜로니를 선별할 수 있다.
- <23> 상기 과정을 거쳐 선발된 것으로서, 벤조산과 그 대표적인 유도체로서 살리실산에 발광 반응을 보이는 균주를 선발하여 이를 대장균 RFM443/pNAG1 (EBNAG1)으로 명명하고, 한국농용미생물보존센터(KACC)에 2003년 4월 4일자로 기탁번호 KACC 91044로 기탁하였다.
- <24> 상기 본 발명에 따른 형질전환체 EBNAG1 (KACC 91044)는 벤조산과 그 유도체 물질을 감지할 경우 발광 강도가 증가하는 성질을 가진다. 따라서, 본 발명에 따른 균주를 이용하여 검체에 노출시켜 이로부터 발생하는 발광의 강도를 측정하는 경우 토양내 대표적 오염원인 벤조산과 그 유도체 물질의 탐지 뿐만 아니라 수질 샘플내의 벤조산과 그 유도체물질의 독성 및 그 유해정도를 민감하게 탐지할 수 있다.
- <25> 이하 본 발명의 내용을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명하기로 한다. 다만 이들 실시예는 본 발명의 내용을 이해하기 위해 제시되는 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 이들 실시예에 한정되어지는 것으로 해석되어져서는 아니된다.
- <26> <실시예 1> 재조합 플라즈미드의 제작

- <27> *Ralstonia* sp. U2로부터 서열번호 1과 서열번호 2의 프라이머를 이용하여 PCR을 이용 *nagR-P_{nagG}* 프로모터 1.33kb의 PCR 산물을 얻었다. PCR 산물은 마지막 벡터로 사용되는 pUCD615에 조합하기 위해 Kpn1 과 EcoR1 제한효소 부위가 필요하다. 그래서 이것을 Kpn1과 EcoR1 제한 효소 부위를 갖고 있는 벡터 pSP-luc+(Promega, USA)를 사용, 벡터의 luc 유전자를 없애기 위해 Xab1과 HindIII 제한효소로 각각 PCR 산물과 벡터 모두 처리하고 37℃에서 2시간 각각 반응 시킨 후 재조합 하였다.(pNAG9)
- <28> 이 pNAG9 플라스미드를 Kpn1과 EcoR1 제한효소로 37℃에서 2시간 각각 반응시킨 후 같은 제한효소로 처리한 *luxCDABE*를 갖고 있는 pUCD615의 다중클로닝사이트에 재조합하여 이를 pNAG1이라 명명하였다. (도 1)
- <29> <실시예 2> 형질전환체 EBNAG1의 제작
- <30> 37℃에서 하루 배양한 RFM443 야생균주를 전기충격을 이용하여 형질전환용 숙주세포로 만들기 위하여 50% 글리세롤을 사용하여 박테리아 배양액에 존재하는 염(salt) 성분을 제거하였다. <실시예 1>에서 제작한 플라스미드를 위에서 제작해 놓은 숙주세포에 삽입하고 전기 충격 형질전환 기기(Bio-RAD, Gene Pulser^R II)에 넣고 2초간 전기 충격을 가하였다. 상기 숙주세포를 암피실린이 50μg/ml가 포함된 LB-아가 플레이트에 도말하였다. 상기 플레이트를 30℃ 배양기에 넣고 하루동안 배양한 후 생성된 콜로니를 암피실린이 50μg/ml 포함된 100ml LB 배지에 시딩(seeding)하였다. 이것을 30℃ 회전 배양기에 넣고 하루 배양 한 후 상용화된 미니프랩 키트(Qiagen)를 사용하여 재조합된 플라스미드(pNAG1)를 뽑아내었다. 플라스미드의 확인을 위

하여 재조합 플라스미드 제작을 위해 사용된 제한효소인 Kpn1과 EcoR1을 처리하였고 이를 0.8% 아가로즈 젤을 사용하여 11kb의 pUCD615 벡터와 1.06kb의 프로모터 부위를 확인하였다. (도 2)

<31> <실시에 3> 형질전환체 EBNAG1의 벤조산 및 그 유도체에 대한 탐지능 확인

<32> EBNAG1 균주를 30℃에서 암피실린이 50 μ g/ml 포함된 100ml LB 배지에서 흡광도 0.08 (600nm) 까지 배양하였다. 발광 강도를 측정하기 위해 배양된 세포 용액을 100 μ l 취하여 96-웰 플레이트(Dynex Inc., USA)의 각 웰에 이미 테스트할 화학물질(벤조산- 농도 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.390625, 0.1953125 mM 혹은 살리실산 - 농도 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.390625, 0.1953125 mM)이 들어있는 불투명 96 웰 플레이트[Microtiter TM, DYNEX technologies, USA]에 각각 분주하였다. 발광 강도를 측정하기 위해 96 웰 발광 측정 장치[Microtiter plate reader, MLX, USA]에 상기 웰 플레이트를 집어넣었다.

<33> 그런 다음, 6시간 동안 발광 정도를 측정하여 화학물질의 농도에 따른 발광 변화를 관찰하였다. 도 3은 벤조산과 그 유도체에 대한 탐지능을 확인하기 위해, 벤조산과 그 대표적 유도체인 살리실산을 농도별로 접종하여 EBNAG1이 내는 발광 신호를 측정한 결과이다. 도 3의 (a)에서 보는 바와 같이 3시간 이후 벤조산의 농도에 따라 발광 강도가 달라지는 것을 볼 수 있으며, 농도에 비례하여 그 강도가 증가하고 있음을 확인할 수 있다. 또한 도 3의 (b)에서 보는 바와 같이 벤조산의 유도체인 살리실산도 마찬가지로 3시간 이후 발광 강도가 살리실산의 농도에 비례하여 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이것은 재조합 플라스미드 pNAG1이 벤조산과 그 유도체의 농도에 따른 독성 탐지 뿐만 아니라 샘플 시료에서의 독성의 탐지 또한 가능하다는 것을 시사한다. 아래 표 1은 다른 벤조산과 그 유도체에 대한 EBNAG1의 반응정도를 나타낸다.

<34> <표 1>

<35>	화합물	최대 RBLa(농도)	MDCb(mM)
	벤조산	344(12.5mM)	0.39
	살리실산	51.2(6.25mM)	0.195
	4-클로로살리실산	92.7(1.56mM)	<0.39
	5-클로로살리실산	8.8(1.56mM)	0.39
	2,4-디히드록시벤조산	11.4(6.25mM)	3.13
	3,4-디히드록시벤조산	10.9(6.25mM)	6.25
	3,5-디히드록시벤조산	13.0(12.5mM)	3.13
	3,4-디메톡시벤질알코올	4.92(6.25mM)	0.39

<36> a- 상대적 생물발광정도(RBL)는 동시에 대조구의 발광량으로 나눈 샘플의 값을 나타낸다.

<37> b- MDC = 최소검출농도, 즉, RBL 값 2를 부여하는 최소 농도.

【발명의 효과】

<38> 본 발명에 의하면 토양 샘플내 존재하는 방향족 화합물 중의 하나인 벤조산과 그 유도체의 독성과 그 유해성을 복잡한 기기분석을 하지 않고서도 분석할 수 있다. 또한, 벤조산 및 그 유도체들은 폴리아로마틱 화합물들의 자연적인 분해과정에서 나타나는 중간대사산물로 이를 탐지함으로써 폴리 아로마틱 하이드로 카본류에 오염되어 있는 토양의 복원 정도를 평가할 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

벤조산 및 그 유도체의 탐지를 위한 형질전환용 재조합 벡터에 있어서, 발광단백질을 코딩하는 소정의 발광유전자와, 상기 발광유전자의 발현을 유도하는 일련의 유전자 세트를 포함하며, 상기 유전자 세트는 조절유전자 nagR과, 상기 유전자 nagR에 의해 코딩되는 단백질 NagR에 의해 상기 발광유전자의 전사를 유도하는 프로모터 부위를 구비함을 특징으로 하는 벤조산 및 그 유도체의 탐지를 위한 형질전환용 재조합 벡터.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 발광유전자의 전사를 유도하는 프로모터 부위는 nag 오페론의 프로모터 부위임을 특징으로 하는 재조합 벡터.

【청구항 3】

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 발광유전자는 luxCDABE유전자임을 특징으로 하는 재조합 벡터

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 재조합 플라스미드는 도 1에 기재된 개열지도를 가지며, 벤조산 및 그 유도체의 탐지를 위한 대장균 형질전환용 pNAG1임을 특징으로 하는 재조합 벡터

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 대장균은 RFM 443임을 특징으로 하는 재조합 벡터

【청구항 6】

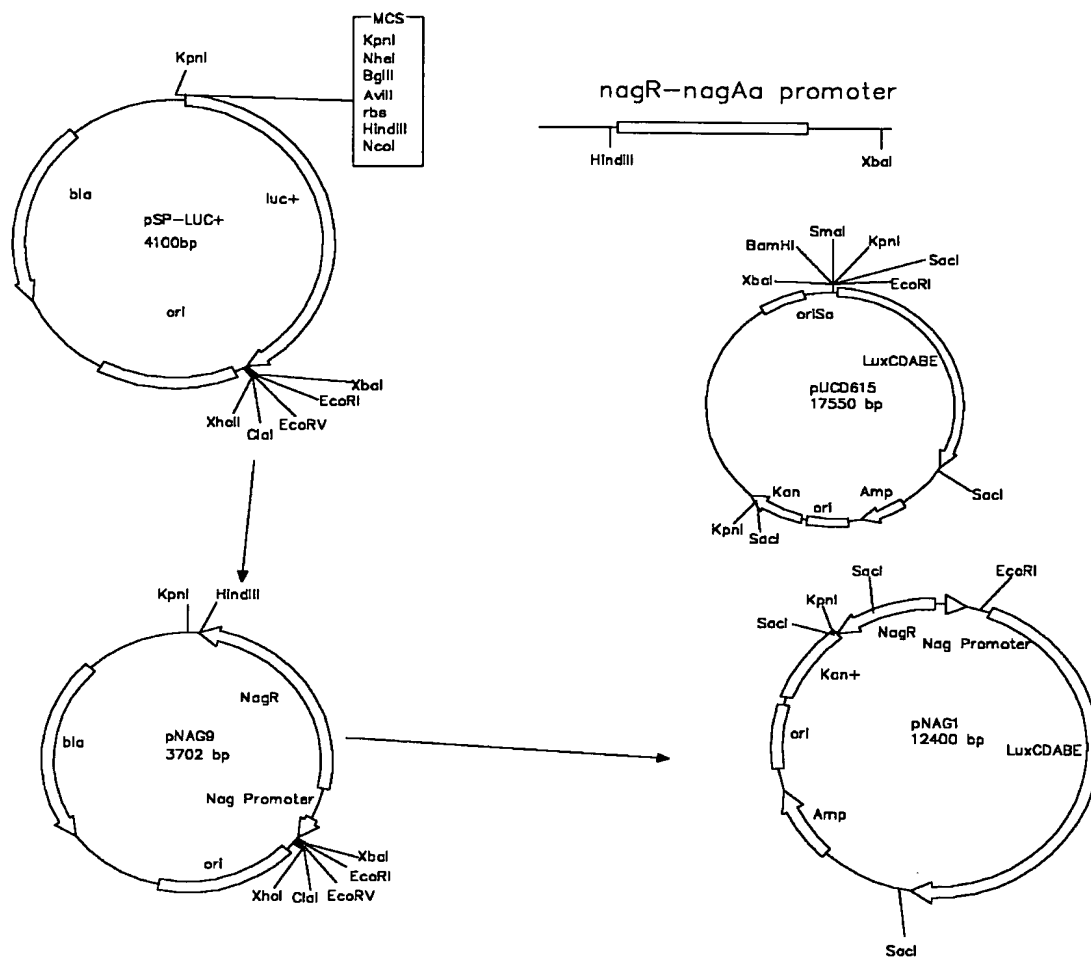
제 4항의 재조합 벡터를 대장균에 형질전환시켜 얻은 형질전환체 EBNAG1(KACC 91044)

【청구항 7】

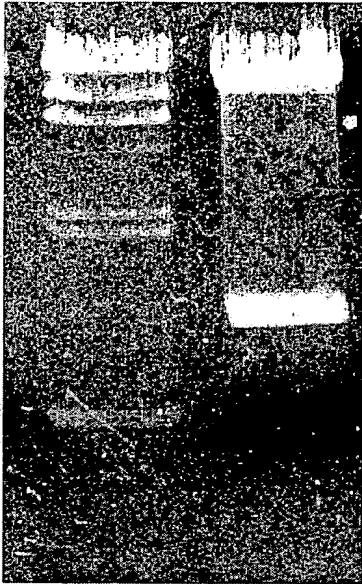
제 6항에 의한 형질전환체와 검체를 반응시켜 발생하는 발광량에 의해 벤조산 및 그 유도체를 탐지하는 방법

【도면】

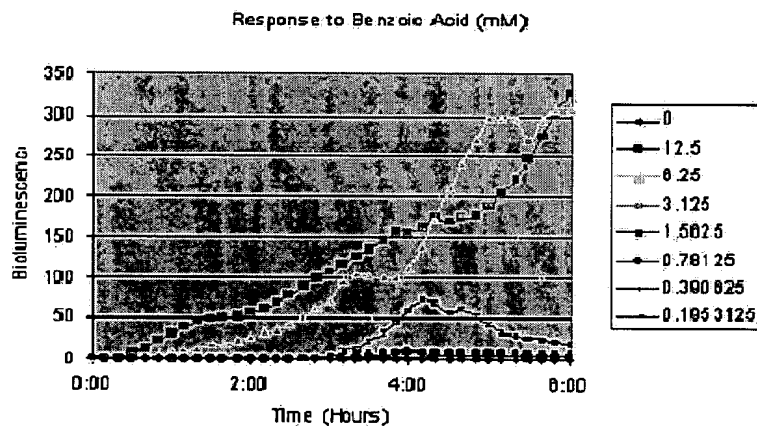
【도 1】



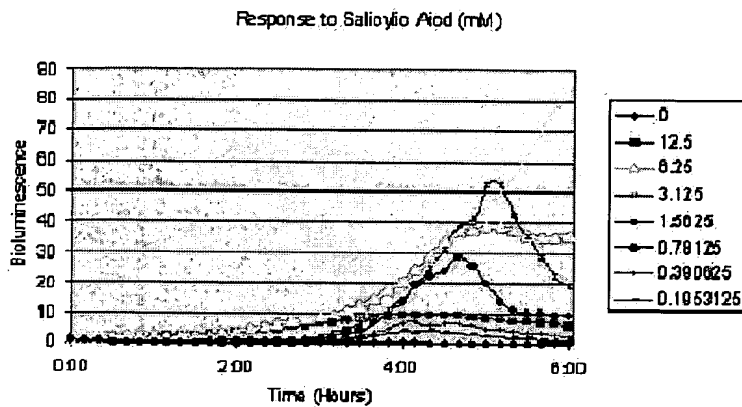
【도 2】



【도 3a】



【도 3b】



【서열목록】

<110> Kwangju Institute of Science and Technology <120> Recombinant Vector
Detecting Benzoate and It's Derivatives, and Transformant thereof, and
Detecting Method Using The Transformant <160> 3 <170> KopatentIn 1.71 <210>
1 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400>
1 gtcaccaata tggaccaggc aacgc 25 <210>
2 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400>
2 ccgcgtctag atgctaattg agggg 25 <210>
3 <211> 1331 <212> DNA <213> Ralstonia sp.U2 <220> <221> gene <222>
(267)..(1172) <223> nagR gene <220> <221> promoter <222> (1173)..(1288)
<223> promoter region of nagAa gene <400> 3 gtcaccaata tggaccaggc aacgcaacag
aacgcggcgc tggtcgagca gatggccgcc 60 gcggcctcca gactgaaggg tcagtccgaa
gagctggtgc agacggtggc ggtgttcaaa 120 ctggcggacg atggcagttc cgacccggct
gcctacgcac aagaccagtc gcatgggaga 180 actgcgccgc accggttggc agaccaccga

catcctgata ctcagccatg gccgaccgag	240 gcagtcaata tgggtttgct ggaagcttat
gcttcagaga aaagctcgac gaacaactga	300 cgtagccaca tgttgcccgg atcccggttg
tacttggcat gccaaaacag gttgatggcg	360 atgtcgggca gcttggccgg gtgcggggat
gtcgtcagac caaaaggcac ttcgcagcga	420 acggcaaaac gctgcggcac ggtcgcgatg
aggtcgggtg tgtgcagaat ggggccgatc	480 gcaatgaaat gcggcaccac cagccgcatg
cgctttttga tgcctgcgag ttcgagcagg	540 ccatcgacct caccgtgtcc ggtgttgagt
gcgaccacgc cgacatgctc cagttcactg	600 aactgtttca ggctcatggg ggatttggcg
cttggatggt ccttgcggaa catgcatacg	660 tagcgggtggc gaaagaggcg ccgctggaag
aatccggtct gtagctctgg cagaagaccc	720 aaggcgagat caaccgcacc ggactccata
tcctccttca gattgccagc attcgggcgc	780 agcgtgctga tctggatgtg aggagctcgt
tgcgcaagcg cttccatcag tgggggcatg	840 aagtacatct cgccgatgtc ggtcattgcc
aagtgaagg tgcgctgtct ggcaaattgg	900 tcgaaagagt cacgggtcgt cagtgccgtc
tgcagcgtgt tgagcgcata gatcacgggc	960 tccgcaagat gcagtgcata cgggtgcggc
tccatgcctt ttgaggtgag caagaacaaa	1020 tcgtccttta gcgccgcacg cagccgttta
agtgaattgc tgacggcagg ctgcgtcagc	1080 cccagttttt cgccggccgt cgatacgctc
cggtcgagca gtagctgggt gaagaccacc	1140 agcagattca agtcgatgtc gcgcagatcc
atgatgcctc accattattc atgctgggtg	1200 ttttaactat cagacttgat ctatagcgct
ataccgatcg acgcgccaga atcgagcca	1260 ttcggagaca actgaaaaaa gagcttgcag
ggaactggta gtagaacccc tcaattagca	1320 tctagacgag g

1331